



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月26日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-292483

出 願 人

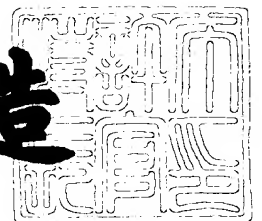
Applicant(s):

環境エンジニアリング株式会社
独立行政法人産業技術総合研究所

2001年10月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3055588

【書類名】 特許願

【整理番号】 EN000731

【提出日】 平成12年 9月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 01/00
C12Q 01/64

【発明の名称】 新規核酸プローブおよびそれを用いる核酸測定方法

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 倉根 隆一郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 金川 貴博

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 鎌形 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 花田 智

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 蔵田 信也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 - 9 - 8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 山田 一隆

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 - 9 - 8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 横幕 豊一

【特許出願人】

【識別番号】 597031070

【氏名又は名称】 財団法人バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 皓二

【特許出願人】

【識別番号】 000156581

【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【代理関係の特記事項】 特許出願人 環境エンジニアリング株式会社及び
特許出願人 財団法人バイオインダストリー協会の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010135

【納付金額】 14,280円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 0 6 8 / 1 0 0

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成11年度
、新エネルギー・産業技術総合開発機構、複合微生物系
等生物資源利用技術開発、産業活力再生特別措置法第3
0条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9717259

【包括委任状番号】 9812328

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規核酸プローブおよびそれを用いる核酸測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的核酸にハイブリダイズする一本鎖のオリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識してなる核酸プローブであって、当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているときはハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエンチャー物質が当該オリゴヌクレオチドに標識され、かつ蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することがないオリゴヌクレオチドであることを特徴とする核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 2】 蛍光物質およびクエンチャー物質が一本鎖のオリゴヌクレオチドの同一塩基の個所に標識されている請求項 1 に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 3】 蛍光物質およびクエンチャー物質が標識されている一本鎖のオリゴヌクレオチドの塩基の個所が 3' 末端または 5' 末端である請求項 1 または 2 に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 4】 蛍光物質が標識されている個所の塩基とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基の距離が、塩基数にて、1～20 である請求項 1 に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 5】 蛍光物質またはクエンチャー物質が、オリゴヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端に標識され、対応するクエンチャー物質または蛍光物質が鎖中に標識されている請求項 4 に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 6】 蛍光物質またはクエンチャー物質がオリゴヌクレオチドの 5' 末端に標識され、かつ対応するクエンチャー物質または蛍光物質が 5' 末端から 6～8 番目の塩基に標識されている請求項 4 または 5 に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 7】 一本鎖のオリゴヌクレオチドが、標的核酸と同鎖長である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項 8】 蛍光物質が、テキサスレッド (Texas red)、EDANS (5-(2'-amin
oethyl)aminonaphthalene-1-sulfonic acid)、テトラメチルローダミン (tetra
methylrhodamine) もしくはその誘導体、F I T C 若しくはその誘導体、ボデピ
ー (BODIPY) FL、ボデピー (BODIPY) R6G、ボデピー (BODIPY) TMR、またはボデ
ピー (BODIPY) TRである請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用の新規
核酸プローブ。

【請求項 9】 クエンチャー物質が、Dabcyl (4-(4'-dimethylaminophenylazo)b
enzoic acid)、Ferroceneまたはその誘導体、methyl viologen、N,N'-dimethyl
-2,9-diazopyreniumである請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸測定用の新
規核酸プローブ。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の新規核酸プローブを標的
核酸にハイブリダイズさせ、測定系の蛍光強度を測定することを特徴とする核酸
測定方法。

【請求項 1 1】 標的核酸が、純粋分離して得た微生物由来、もしくは動物由来
の細胞内もしくはそれら細胞のホモジネートの核酸である請求項 1 0 に記載の核
酸測定方法。

【請求項 1 2】 標的核酸が、複合微生物系、あるいは共生微生物系の細胞内も
しくは細胞のホモジネートの核酸である請求項 1 0 に記載の核酸測定方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛍光物質およびクエンチャー物質で標識された新規核酸プローブに
関する。詳しくは、当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているとき
はハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエ
ンチャー物質が、ステムループ構造を形成することのない一本鎖のオリゴヌクレ
オチドに標識されているものである。また、当該核酸プローブを用いる核酸測定
方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

従来知られている、蛍光物質とクエンチャー物質が一本鎖のオリゴヌクレオチドに標識されている核酸プローブとして、分子ビーコン (Tyagi et al., Nature Biotech., 14:303~308, 1996.) がある。

この核酸プローブは、オリゴヌクレオチドの一端に蛍光物質であるEDANS (5-(2'-aminoethyl)aminonaphthalene-1-sulfonic acid) (以下単にEDANSという。)、他端にクエンチャー物質Dabcyl (4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid) (以下単にDabcylという。) が標識されている。そしてその両端部は塩基配列において互いに相補性があるので2重鎖を形成して、プローブ全体としてヘアピン構造 (hairpin stem) すなわちステムループ構造を形成するように塩基配列が設計されている。その構造のために液中においては、Forster共鳴エネルギーのため、蛍光物質の発光は、クエンチャー物質により抑制されている。しかし、標的核酸にハイブリダイズするとステムループ構造が壊れるために、蛍光物質とクエンチャー物質の距離が大きくなるので、Forster共鳴エネルギーの移動が起こらなくなる。そのために、蛍光物質の発光が起こるようになる。

【0003】

この分子ビーコンは、標的核酸にハイブリダイズする塩基配列とステムループ構造を形成させる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成しなければならないという不便さがある。ステムループ構造を形成させる塩基配列および塩基数は、プローブにハイブリダイズする標的核酸の塩基配列および塩基数、測定系のマグネシウム濃度、測定温度などを考慮して設計しなければならない。すなわち、ステムループ構造を維持する力と標的核酸にハイブリダイズする力が競合するので、ステムループ構造を維持する力は核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズする力より弱くなるように、ステムループ構造を形成させる塩基配列および塩基数を設計しなければならない。このように設計が繁雑である。また、ステムループ構造を有するために標的核酸に十分にハイブリダイズするのに時間が掛かる。例えば約15分は必要とする。それらが原因して、それを用いて核酸を測定すると、測定に時間が掛かる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、前記の状況に鑑み、一本鎖のオリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識してなる核酸プローブであって、設計が容易で、短時間で核酸測定ができる核酸プローブを提供することである。さらに、それを用いた核酸測定方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するにあたり、種々の核酸プローブについて詳しく検討し、試行錯誤的に多数のプローブを試作した。その結果、蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することがないオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブであっても、特定の位置に当該物質を標識することにより、蛍光物質の発光にクエンチャー物質が作用し、当該発光にクエンチング効果 (quenching effect) を及ぼす場合があることの知見を得た。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0006】

すなわち、本発明は、

1) 標的核酸にハイブリダイズする一本鎖のオリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識してなる核酸プローブであって、当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているときはハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエンチャー物質が、当該オリゴヌクレオチドに標識され、かつ蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することがないオリゴヌクレオチドであることを特徴とする核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

【0007】

2) 蛍光物質およびクエンチャー物質が一本鎖のオリゴヌクレオチドの同一塩基の個所に標識されている前記 1) に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

3) 蛍光物質およびクエンチャー物質が標識されている一本鎖のオリゴヌクレオチドの塩基の個所が 3' 末端または 5' 末端である前記 1) または 2) に記載の

核酸測定用の新規核酸プローブ、

【0008】

4) 蛍光物質が標識されている個所の塩基とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基の距離が、塩基数にて、1～20である前記1)に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

5) 蛍光物質またはクエンチャー物質が、オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に標識され、対応するクエンチャー物質または蛍光物質が鎖中に標識されている前記4)に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

【0009】

6) 蛍光物質またはクエンチャー物質が、オリゴヌクレオチドの5'末端に標識され、かつ対応するクエンチャー物質または蛍光物質が5'末端から6～8番目の塩基に標識されている前記4)または5)に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

7) 一本鎖オリゴヌクレオチドが、標的核酸と同鎖長である前記1)～6)のいずれか1項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ、また、

8) 前記1)～7)のいずれか1項に記載の新規核酸プローブを標的核酸にハイブリダイズさせ、測定系の蛍光強度を測定することを特徴とする核酸測定方法、を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】

次に好ましい実施の形態を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

本発明の技術用語において、核酸プローブ、ハイブリダイズ、ハイブリダイゼーション、ステムループ構造、クエンチング、クエンチング効果とは、現在、生化学、分子生物学、遺伝子工学などで使用されている用語と同じ意味である。

【0011】

本発明の特徴は、標的核酸にハイブリダイズする一本鎖のオリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識してなる核酸プローブであって、当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているときは、ハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエンチャー物質が、当該

オリゴヌクレオチドに標識され、かつ蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することがないオリゴヌクレオチドであることを特徴とする核酸測定用の新規核酸プローブである。

【 0 0 1 2 】

本発明において標的核酸とは、濃度の測定を目的とする核酸若しくは遺伝子のことを云う。精製の有無を問わない。また、濃度の大小も問わない。各種の核酸が混在していてもよい。例えば、複合微生物系（複数微生物のRNA若しくは遺伝子DNAの混在系）又は共生微生物系（複数の動植物及び／又は複数の微生物のRNA若しくは遺伝子DNAの混在系）における濃度の測定を目的とする特定核酸である。尚、標的核酸の精製が必要な場合は従来公知の方法で行うことができる。例えば、市販されている精製キット等を使用して行うことができる。上記の核酸の具体例として、DNA、RNA、PNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド (oligodeoxyribonucleotides)、オリゴリボヌクレオチド (oligoribonucleotides) 等、また、前記核酸のキメラ (chimera) 核酸等を例示することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明において蛍光物質とは、一般に核酸プローブに標識して、核酸の測定・検出に用いられている蛍光色素の類である。例えば、フルオレセイン (fluorescein) 又はその誘導体類 {例えば、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) (FITC) 若しくはその誘導体等、Alexa 488、Alexa 532、cy3、cy5、6-joe、EDANS、ローダミン (rhodamine) 6G (R6G) 又はその誘導体 (例えば、テトラメチルローダミン (tetramethylrhodamine) (TMR)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (tetramethylrhodamine isothiocyanate) (TMRITC)、x-ローダミン (x-rhodamine)、テキサスレッド (Texas red)、ボデピー (BODIPY) FL (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C3 (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C6 (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 5-FAM

(商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) TMR (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、又はその誘導体 (例えば、ボデピー (BODIPY) TR (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) R6G (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 564 (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 581 (商標名；モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国) 等を挙げることができる。これらの中でも、FITC、EDANS、テキサスレッド、6-joe、TMR、Alexa 488、Alexa 532、ボデピー (BODIPY) FL/C3、ボデピー (BODIPY) FL/C6等を好適なものとして、また、EDANS、テキサスレッド、FITC、TMR、6-joe、ボデピー (BODIPY) FL/C3、ボデピー (BODIPY) FL/C6をより好適なものとして挙げることができる。

【 0 0 1 4 】

クエンチャー物質とは、前記蛍光物質に作用して、その発光を抑制もしくは消光する物質である。例えば、Dabcyl、Ferroceneまたはその誘導体、methyl viologen、N,N'-dimethyl-2,9-diazopyreniumなど、好適にはDabcylなどを挙げることができる。

前記のような、蛍光物質およびクエンチャー物質を、オリゴヌクレオチドの特定の位置に標識することにより、蛍光物質の発光は、クエンチャー物質によりクエンチング効果を受ける。

【 0 0 1 5 】

本発明において、本発明の核酸プローブを形成し、蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することのない一本鎖のオリゴヌクレオチドとは、蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間で、少なくとも2か所以上の個所の塩基配列の相補性から、自己鎖中において2重鎖を形成し、ステムループ構造を形成することのないオリゴヌクレオチドのことを云う。

【 0 0 1 6 】

本発明の核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているときは、ハイブリ

ダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエンチャー物質を、本発明のオリゴヌクレオチドに標識するには、以下のように行えばよい。

蛍光物質が標識されている個所の塩基とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基の距離が塩基数にしてゼロすなわち蛍光物質およびクエンチャー物質が一本鎖のオリゴヌクレオチドの同一塩基の個所に標識するか、または、塩基数にて1～20、好ましくは5～15、より好ましくは6～8であるように、各物質をオリゴヌクレオチドに標識するのがよい。しかしながら、塩基の間隔は、プロープの塩基配列、修飾に用いる蛍光物質とクエンチャー物質、それらをオリゴヌクレオチドに結合させるリンカーの長さなどに強く依存する。それで、塩基間隔を完全に特定するのはむずかしく、前記の塩基間隔はあくまでも一般的例であり、例外的なものが多い。

【0017】

標識する個所は、一本鎖のオリゴヌクレオチドの同一塩基の個所に標識する場合、一方を塩基に、他方を塩基以外の部分、すなわちリン酸部、またはリボース部もしくはデオキシリボース部に標識するのが好適である。なお、この場合、3'末端部または5'末端部に標識するのが好適である。

【0018】

または、蛍光物質とクエンチャー物質を標識する塩基の距離を塩基数にて1～20、好ましくは5～15、より好ましくは6～8であるようにする場合、各物質をオリゴヌクレオチドの鎖中に標識してもよく、また一方をオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に標識し、対応する他の物質を鎖中に標識してもよい。好ましくは蛍光物質またはクエンチャー物質をオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に、対応するクエンチャー物質または蛍光物質をそれらの末端から5～15番目、好ましくは6～8番目の塩基に標識するのがよい。この場合、3'末端部、または5'末端部に標識するとき、塩基、リン酸部、またはリボース部もしくはデオキシリボース部に、好ましくはリン酸部、リボース部もしくはデオキシリボース部に、より好ましくはリン酸部に標識するのがよい。また鎖中に標識する場合は、鎖中の塩基に標識するのが好適である。

なお、前記の各場合において塩基に修飾する場合、修飾可能なところであれば

どこでもよいのであるが、例えば、プリン塩基のOH基、アミノ基、2位のN、7位のN、8位のC、また、ピリミジン塩基のOH基、アミノ基、メチル基、2位のNに修飾するのがよい（ANALYTICAL BIOCHEMISTRY、225巻、32～38頁、1998年）。

【0019】

オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド体でも、デオキシリボヌクレオチド体で構成されていてもよい。また、2'-O-Methyl Oligoribonucleotideのような修飾されたRNAでもよい。また、それらのキメラ体でもよい。そしてその塩基数は5～50であり、好ましくは10～25、特に好ましくは15～20である。標的核酸と同じ塩基数でもよい。しかしながら、50以上の場合は細胞膜の透過性が悪くなり、本発明の適用範囲を狭めることになる。5以下の場合、非特異的ハイブリダイゼーションが惹起し易くなり、測定誤差が大きくなる。

その塩基配列は、標的核酸に特異的にハイブリダイゼーションするものであればよい。

【0020】

本発明の核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、通常の一般的オリゴヌクレオチドの製造方法で製造できる。例えば、化学合成法、プラスミドベクター、ファージベクター等を使用する微生物法等で製造できる（Tetrahedron letters、22巻、1859～1862頁、1981年；Nucleic acids Research、14巻、6227～6245頁、1986年）。尚、現在、市販されている核酸合成機を使用するのが好適である（例えば、ABI394（Perkin Elmer社製、USA））。また、商業的依頼合成を引き受けている企業体があるので、塩基配列の設計だけを行ってそこに合成を依頼するのが最も簡便なやり方である。そのような企業体として、タカラ（日本）、エスベックオリゴなどを例示することができる。

【0021】

オリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識するには、従来公知の標識法のうちの所望のものを利用することができる（Nature Biotechnology、14巻、303～308頁、1996年；Applied and Environmental Microbiology、63巻、1143～1147頁、1997年；Nucleic acids Research、24巻、4532～4535頁、19

96年)。例えば、5'末端に蛍光物質またはクエンチャー物質を結合させる場合は、先ず、常法に従って5'末端のリン酸基にリンカーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ または $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する。これらの導入体は市販されているので市販品を購入してもよい（メドランド・サーティファイド・レージント・カンパニー（Midland Certified Reagent Company））。この場合、 n は3～8、好ましくは6、7である。このリンカーに $-SH$ 基または $-NH_2$ 基に反応性を有する蛍光物質またはクエンチャー物質を反応させることによりオリゴヌクレオチドを標識できる。

【0022】

また、オリゴヌクレオチドの3'末端に蛍光物質またはクエンチャー物質を結合させるには、リボースの2'位もしくは3'位のCのOH基、またはデオキシリボースの3'位CのOH基にリンカーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-NH_2$ もしくは $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。これらの導入体も前記と同様にして市販されているので市販品を購入してもよい（メドランド・サーティファイド・レージント・カンパニー（Midland Certified Reagent Company））。また、前記OH基にリン酸基を導入して、リン酸基のOH基にリンカーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ もしくは $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する。これらの場合、 n は3～9、好ましくは4～8である。このリンカーに、 $-NH_2$ 基もしくは $-SH$ 基に反応性を有する蛍光物質もしくはクエンチャー物質を反応させることによりオリゴヌクレオチドを標識できる。

【0023】

なお、オリゴヌクレオチドのリボース部、デオキシリボース部、リン酸部、また塩基部、リンカー、蛍光物質、クエンチャー物質に、それらの反応性を高めるためにアミノ基を導入するような場合、キット試薬（例えば、Uni-link aminomodifier（CLONTECH社製、米国）、フルオ・リポーターキット（FluoReporter Kit）F-6082、F-6083、F-6084、F-10220（いずれもモレキュラー・プローベ（Molecular Probes）社製、米国））を用いるのが便利である。そして、常法に従ってオリゴリボヌクレオチドに蛍光物質とクエンチャー物質を結合させることができる。

また、前記の合成において、各機能基への保護基の導入、保護基の離脱は通常の公知の方法で行うことができる。

【 0 0 2 4 】

前記のようにして、蛍光物質とクエンチャー物質で標識されたオリゴヌクレオチドを合成できるが、中間合成物、完成された合成物はゲル濾過、逆相等の液体クロマトグラフィー等で精製するのがよい。このようにして本発明の核酸プローブが得られる。

【 0 0 2 5 】

以上のように、本発明の核酸プローブの設計は、標的核酸にハイブリダイズする塩基配列のオリゴヌクレオチドに蛍光物質とクエンチャー物質を標識するだけでよいので、設計が簡便である。

本発明の核酸プローブの作成もプローブの設計さえできれば、オリゴヌクレオチドの合成と同様に依頼合成を行って入手することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明においては、前記した本発明の核酸プローブを使用することで、標的核酸の濃度を短時間で、簡便かつ特異的に測定することができる。測定方法は、従来の核酸プローブを用いる核酸測定方法と同様に行えばよい。例えば以下のとおりである。

本発明の測定方法において、まず、測定系に本発明の核酸プローブを添加し、標的核酸にハイブリダイズさせる。その方法は、通常の既知方法で行なうことができる (Analytical Biochemistry, 183巻、231～244頁、1989年 ; Nature Biotechnology, 14巻、303～308頁、1996年 ; Applied and Environmental Microbiology, 63巻、1143～1147頁、1997年)。

例えば、ハイブリダイゼーションの条件は、塩濃度が0～2モル濃度、好ましくは0.1～1.0モル濃度、pHは6～8、好ましくは6.5～7.5である。

【 0 0 2 7 】

また、ハイブリダイゼーション温度は、本発明の核酸プローブが標的核酸の特異的部位にハイブリダイズして得られる核酸ハイブリッド複合体の T_m 値 ± 10

℃の範囲内であるのが好ましい。このようにすることにより非特異的なハイブリダイゼーションを防止することができる。 $T_m - 10^\circ\text{C}$ 未満のときは、不完全なハイブリダイゼーションが起こり、 $T_m + 10^\circ\text{C}$ を越えるときは、非特異的なハイブリダイゼーションが起る。尚、 T_m 値は本発明の核酸プローブを設計するのに必要な実験と同様にして求めることができる。すなわち、本発明の核酸プローブとハイブリダイズする（当該核酸プローブに対して相補する塩基配列の）オリゴヌクレオチドを前記の核酸合成機等で化学合成し、当該核酸プローブとの核酸ハイブリッド複合体の T_m 値を通常の方法で測定する。

【0028】

また、その反応時間は1秒間～180分間で十分である。なお、好ましくは5秒間～90分間である。多くの場合、実施例に示されるように10分以内で十分である。1秒間未満のときは、ハイブリダイゼーションにおいて未反応の本発明の核酸プローブが多くなる。また、反応時間を余り長くしても特に意味がない。なお、反応時間は核酸種、すなわち、核酸の長さ、あるいは塩基配列によって大きく影響を受ける。

【0029】

反応液中の標的核酸の濃度：0.1～10.0 nMであるのが好ましい。反応液中の本発明の核酸プローブの濃度：1.0～25.0 nMであるが好ましい。検量線を作成する場合は、標的核酸に対して、本発明の核酸プローブを1.0～2.5の比率で用いるのが望ましい。

【0030】

前記のようにして、本発明の核酸プローブを標的核酸にハイブリダイズさせる。そして、ハイブリダイゼーションの前後で、蛍光物質の発光強度を蛍光光度計で測定し、蛍光強度の増加を求める。その蛍光強度の増加の大きさは標的核酸の濃度と比例するので、標的核酸の濃度を求めることができる。

実際、試料中の未知濃度の標的核酸を測定する場合、上記の条件で先ず、標準サンプルを用いて検量線を作成する。そして、複数の濃度の本発明の核酸プローブを試料に添加して、それぞれ蛍光強度値を測定する。

【0031】

本発明の核酸測定法の原理は、前記のごとくであるが、本発明は各種の核酸測定方法、例えば、FISH方法などに好適に適用できる。

すなわち、本発明の方法は微生物、植物、動物の各細胞内、各細胞ホモジネートの核酸に適用できる。また、色々の種類の微生物が混在するか、若しくは一種類以上の微生物が動物や植物由来の細胞と共に混在していて、相互に単離できない微生物系（複合微生物系、共生微生物系）の細胞内若しくは細胞のホモジネート等の核酸測定に好適に適用できる。ここでいう微生物とは一般的にいう微生物のことで、特に限定されるものではない。例えば、真核微生物、原核微生物、その他、マイコプラズマ、ウイルス、リッケチャ等を挙げることができる。そして、この系でいう標的核酸とは、これらの微生物系において、例えば、どのように活躍しているのかを調べたい菌株の細胞に特異性を有する塩基配列をもつ核酸のことである。例えば、特定菌株の 5 S r R N A、1 6 S r R N A 若しくは 2 3 S r R N A 又はそれらの遺伝子 D N A の特定配列である。

【 0 0 3 2 】

本発明の核酸プローブを複合微生物系又は共生微生物系に添加し、特定菌株の 5 S r R N A、1 6 S r R N A 若しくは 2 3 S r R N A 又はそれらの遺伝子 D N A の量を測定することにより、当該系における特定菌株の存在量を測定することができる。尚、複合微生物系又は共生微生物系のホモジネートに前記核酸プローブを添加して、ハイブリダイゼーション前後における蛍光物質の発光強度を測定して特定菌株の存在量を測定する方法も、本発明の技術的範囲内とする。

【 0 0 3 3 】

前記の測定方法は、例えば、以下の如くである。即ち、本発明の核酸プローブを添加する前に、複合微生物系又は共生微生物系の温度、塩濃度、pH を前記の条件に調整する。複合微生物系又は共生微生物系における特定菌株は、細胞数として $10^7 \sim 10^{12}$ 個/mL、好ましくは $10^9 \sim 10^{10}$ 個/mL に調整することが好適である。それは希釈、又は遠心分離等による濃縮等で行うことができる。細胞数が 10^7 個/mL 未満のときは、蛍光強度が弱く、測定誤差が大きくなる。 10^{12} 個/mL を超えるときは、複合微生物系又は共生微生物系の蛍光強度が強すぎるため、特定微生物の存在量を定量的に測定することができなくなる。た

だし、この範囲は使用する蛍光光度計の性能に依存する。

【 0 0 3 4 】

添加する本発明の核酸プローブの濃度は、複合微生物系又は共生微生物系における特定菌株の細胞数に依存する。細胞数 $1 \times 10^8 / \text{mL}$ に対して $0.1 \sim 10.0 \text{ nM}$ 濃度、好ましくは $0.5 \sim 5 \text{ nM}$ 濃度、より好ましくは 1.0 nM 濃度である。 0.1 nM 未満のときは、特定微生物の存在量を正確に反映したデータにならない。しかし、最適な本発明の核酸プローブの量は、細胞内の標的核酸量に依存するために一概にはいえない。

【 0 0 3 5 】

次に本発明において前記核酸プローブと特定菌株の 5 S r R N A 、 16 S r R N A 若しくは 23 S r R N A 又はその遺伝子 DNA にハイブリダイズさせるときの反応温度は、前記した条件と同様である。また、その反応時間も前記の条件と同様である。

前記のような条件で本発明の核酸プローブを特定菌株の 5 S r R N A 、 16 S r R N A 若しくは 23 S r R N A 又はその遺伝子 DNA にハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション前後の複合微生物系又は共生微生物系の蛍光物質の発光強度を測定する。

【 0 0 3 6 】

なお、本発明において、複合微生物系または共生微生物系における微生物以外の成分は、本発明の核酸プローブと特定菌株の 5 S r R N A 、 16 S r R N A もしくは 23 S r R N A またはそれらの遺伝子 DNA とのハイブリダイゼーションを阻害しない限り、またオリゴヌクレオチドに標識されている蛍光物質の発光またクエンチャー物質の作用を阻害をしない限り、特に限定されない。例えば、 $\text{K H}_2\text{P O}_4$ 、 $\text{K}_2\text{H P O}_4$ 、 $\text{N a H}_2\text{P O}_4$ 、 $\text{N a}_2\text{H P O}_4$ などのリン酸塩、硫酸、硝酸、尿素などの無機窒素類、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのイオンの各種塩類、マンガン、亜鉛、鉄、コバルトなどの微量金属イオンの硫酸塩、塩酸、炭酸塩などの各種塩類、更にビタミン類などが適当に含まれていてもよい。もし、上記の阻害が観察される場合は、遠心分離などの操作で複数の微生物が混在する菌体を分離し、再び緩衝液系などに懸濁すればよい。

【 0 0 3 7 】

上記の緩衝液としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液、トリス・グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、グット緩衝液などの各種緩衝液をも用いることができる。緩衝液の濃度は、ハイブリダイゼーション、蛍光色素の発光を阻害しない濃度である。その濃度は緩衝液の種類に依存する。緩衝液のpHは4～12、好ましくは5～9である。

【 0 0 3 8 】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

実施例 1

核酸プローブの合成：

標的核酸の塩基配列をオリゴデオキシリボヌクレオチドからなる(5')GGGGGGAA
AAAAAAA(3')として、本発明の核酸プローブの合成：次の順序で行った。

【 0 0 3 9 】

核酸プローブのデザイン：

標的核酸の塩基配列が(5')GGGGGGAAAAAAA(3')であるから核酸プローブの塩基配列は簡単にオリゴデオキシリボヌクレオチドからなる(5')TTTTTTTTTCCCCC(3')と設計できた。また本発明の核酸プローブを以下のようにデザインした。5'末端のリン酸に蛍光物質テキサスレッド(Texas Red)を、5'末端から7番目のチミンの塩基環の6位CのOH基にクエンチャー物質Dabcylを標識するものとした(Texas Red-(5')TTTTTT(Dabcyl)-TTTCCCCC(3')なるデザイン)。

【 0 0 4 0 】

5' Amino-Modifier C6キット(Glen Research社、米国)を用いてチミジル酸のリン酸基をリンカー $(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$ で修飾した。Amino-Modifier C2dTキット(Glen Research社、米国)を用いてチミジンの塩基環の6位CのOH基をリンカー $(\text{CH}_2)_7\text{-NH}_2$ で修飾した。これらの修飾チミジル酸およびチミジンを用いて、DNA合成機(ABI394)(株式会社パーキンエルマージャパンアプライド)を用いて、次の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。すなわち、 $\text{HS-(CH}_2)_6\text{-(5')TTTTTT(H}_2\text{N-(CH}_2)_7\text{)-TTTCCCCC(3')}$ の塩基配列をもつデオキシ

リボオリゴヌクレオチドで、5' 末端のリン酸基が前記リンカー $(\text{CH}_2)_6\text{-S}$
Hで、また5' 末端から7 番目チミンの塩基環の6 位CのOH基がリンカー $(\text{CH}_2)_7\text{-NH}_2$ で修飾されている。なお、DNAの合成はフォスフォアミダイト
法で5' 末端TrONで行った。合成した後、保護基の脱離は2 8 %アンモニア水で
5 5℃、5 時間で行った。

【0 0 4 1】

合成物の精製：

前記得られた合成オリゴヌクレオチドを乾固し乾固物を得た。それを0. 5 M
NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(pH 9. 0)に溶解した。当該溶解物をNAP
-10カラム(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。

【0 0 4 2】

クエンチャー物質の標識：

前記濾過物を乾固し、1 5 0 μLの滅菌水に溶解した(オリゴヌクレオチドA
溶液)。1 mgのDabcyl-NHS(Molecular Probes社、USA)を1 0 0 μLのDMF(ジメチルホルムアミド)に溶解し、前記オリゴヌクレオチドA溶液、1 M Na
HCO₃/Na₂CO₃バッファー1 5 0 μLを加え、攪拌後、室温で1 晩反応させ
た。

【0 0 4 3】

合成物の精製：

前記反応物をNAP-25(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去
した。次いで、2 %TFAで保護基を脱離した。SEP-PAC C₁₈カラムを用いる逆相
HPLCを行い、前記オリゴヌクレオチドのリンカー $(\text{CH}_2)_7\text{-NH}_2$ にクエンチ
ャー物質Dabcylを結合させた目的物を分画した。分画物をNAP-10(ファルマシア社
製)でゲル濾過した。

【0 0 4 4】

蛍光物質の標識：

前記ゲル濾過物を乾固し、1 5 0 μLの滅菌水に溶解した(オリゴヌクレオチ
ドB溶液)。1 mgのSulforhodamine 101 Acid Chloride(DOJINDO社、日本)
を1 0 0 μLのDMFに溶解し、前記オリゴヌクレオチドB溶液、1 M NaHCl

$\text{O}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ バファー $150\ \mu\text{L}$ を加え、攪拌後、室温で 1 晩反応させ、5' 末端のリンカー $(\text{CH}_2)_6-\text{SH}$ に蛍光物質テキサスレッド (Texas-Red) を結合させた。

【0045】

合成物の精製

前記反応物を NAP-25 (ファルマシア社製) でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。前記同様の逆相 HPLC を行い、5' 末端より 7 番目のチミン塩基に前記クエンチャー物質を結合させたオリゴヌクレオチドで、かつ 5' 末端に蛍光物質テキサスレッド (Texas-Red) を付加した本発明の核酸プローブ、すなわち、蛍光物質とクエンチャー物質で標識された本発明の核酸プローブを得た。なお、本発明の核酸プローブは前記クエンチャー物質を結合させたオリゴヌクレオチドより遅れて溶出された。

【0046】

本発明の核酸プローブの定量は、分光光度計で $260\ \text{nm}$ の値を測定することにより行った。また、当該プローブについて、分光光度計を用いて $650\ \text{nm} \sim 220\ \text{nm}$ の吸光度のスキャンを行った結果、Dabcyl、テキサスレッド、DNA の吸収があることを確認した。さらに、前記同様の逆相 HPLC で精製物の純度検定を行った結果、シングルピークであることを確認した。

前記のように、合成された本発明の核酸プローブでは、蛍光物質であるテキサスレッドおよびクエンチャー物質である Dabcyl が標識されている個所の塩基鎖間で、少なくとも 2 か所で相補性のある塩基配列はない。それで、自己鎖中で 2 重鎖を形成することがない。すなわちステムループ構造を形成することがない。

【0047】

なお、上記の逆相クロマトグラフィーの条件は次の通りである：

溶出溶剤 A : $0.05\text{N TEAA } 5\%\text{CH}_3\text{CN}$

溶出溶剤 B (グラジエント

(gradient) 用) : 0.05N

$\text{TEAA } 40\%\text{CH}_3\text{CN}$

カラム : SEP-PAK C18 ; $6 \times 250\text{mm}$

溶出速度：1.0ml/min

温度：40℃

検出：254nm

【 0 0 4 8 】

実施例 2

標的核酸の合成：

前記のオリゴヌクレオチドの合成と同様にして、(5')GGGGGGA(AAAAAAAAAA(3')なる塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成して、本発明の標的核酸とした。

【 0 0 4 9 】

実施例 3

標的核酸に本発明のプローブをハイブリダイズさせた反応系の蛍光強度測定：

石英セル（10mm×10mm）（容量4mL）に500μLの緩衝液（2M NaCl、200mM Tris-HCl：pH=7.2）を添加し、次に1460μLの滅菌蒸留水を添加し攪拌した。そこに、8.0μLの本発明の核酸プローブ（10μM）溶液を添加して攪拌した。35℃に保温して蛍光強度を時間を追って測定した（励起波長：581nm（8nm幅））、測定蛍光波長：603nm（8nm幅）。ついで、160nM濃度の標的核酸溶液32.0μLを添加し、攪拌した。そして時間を追って蛍光強度を前記と同じ条件で測定した。その結果を図1に示した。図から、標的核酸を添加したことにより、蛍光強度が増加し、増加度が極めて短時間すなわち100秒（1分40秒）以内に一定になることが分かる（なお、分子ビーコンの場合、約15分を必要とする：Nature Biotechnology、14巻、303～308ページ、1998年）。このことは本発明の核酸測定方法が短時間で実施できることを示している。

【 0 0 5 0 】

実施例 4

標的核酸の測定：

標的核酸の濃度を種々替える以外は前記と同じ条件で、各濃度について蛍光強度を測定した。その結果を図2に示した。図から、標的核酸の濃度に応じて蛍光強度も増加し、比例関係が一直線になるが判明した。

以上の結果から、本発明の核酸プローブを用いれば、精度のよい核酸測定ができることが認識される。

【 0 0 5 1 】

【発明の効果】

前記ように本発明の核酸プローブは標的核酸にハイブリダイズする塩基配列に設計さえすればよいので、設計が繁雑でなく容易である。また、本発明の核酸プローブを用いると標的核酸が正確に測定できる。しかも、簡便で、短時間に測定できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の核酸プローブを含む溶液系に標的核酸を添加した場合に伴う溶液系の蛍光強度の変化。

横軸：時間（秒）、縦軸：蛍光強度

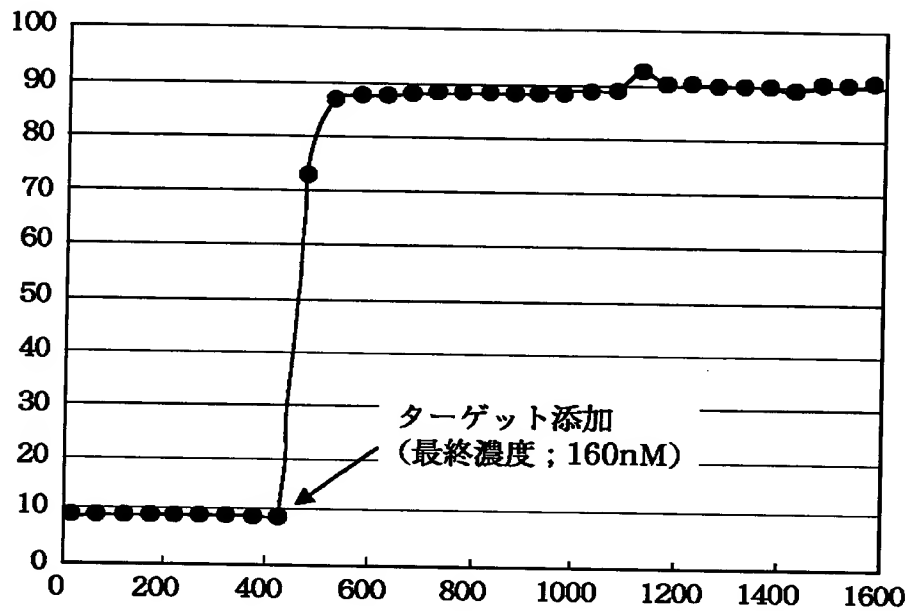
【図 2】

本発明の核酸プローブによる標的核酸の検量線

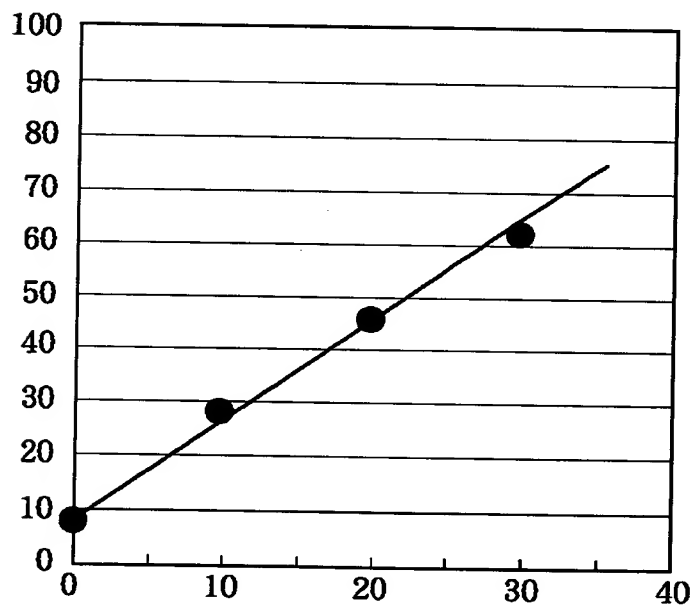
横軸：標的核酸濃度、縦軸：蛍光強度

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標的核酸にハイブリダイズする一本鎖のオリゴヌクレオチドに蛍光物質およびクエンチャー物質を標識してなる核酸プローブであって、設計が容易で短時間に核酸測定ができる核酸プローブおよびそれを用いた核酸測定方法を提供すること。

【解決手段】 当該核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしているときは、ハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度が増加するように、蛍光物質とクエンチャー物質がオリゴヌクレオチドに標識され、かつ蛍光物質が標識されている個所とクエンチャー物質が標識されている個所の塩基鎖間でステムループ構造を形成することがないオリゴヌクレオチドからなる新規核酸プローブおよびそれを用いる核酸測定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-292483
受付番号	50001240778
書類名	特許願
担当官	仲村 百合子 1730
作成日	平成12年12月14日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	597031070
【住所又は居所】	東京都中央区八丁堀2-26-9
【氏名又は名称】	財団法人 バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【特許出願人】

【識別番号】	000156581
【住所又は居所】	東京都千代田区東神田一丁目9番8号
【氏名又は名称】	環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】	220000404
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1-1-3
【氏名又は名称】	工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目30番地 ア コスビル201号室 吉田特許事務所

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【復代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目30番地 ア コスビル201号室 吉田特許事務所

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成12年10月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-292483

【補正をする者】

【識別番号】 000156581

【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 倉根 隆一郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 金川 貴博

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 鎌形 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 鳥村 政基

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 蔵田 信也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 山田 一隆

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 横幕 豊一

【その他】 発明者の氏名を「鳥村 政基」とすべきところを「花田 智」と誤って記載してしまいました。発明者の記載についての誤記の訂正を致しますので、よろしくお願い申し上げます。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-292483

【承継人】

【識別番号】 301000011

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

【氏名又は名称】 経済産業省産業技術総合研究所長 日下 一正

【連絡先】 部署名 経済産業省産業技術総合研究所
筑波研究支援総合事務所特許管理課
担当者 楠本 眞 電話番号 0 2 9 8 - 6
1 - 2 1 7 9

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証明する書面 1

【援用の表示】 平成 3 年特許願第 2 8 5 6 1 号

【プルーフの要否】 要

特 2000-292483

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-292483
受付番号	50100038921
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成13年 2月 9日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 1月15日
【承継人】	申請人
【識別番号】	301000011
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	経済産業省産業技術総合研究所長

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2000-292483
【承継人】
 【識別番号】 301021533
 【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川弘之
 【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所
 知的財産部知的財産管理室
 担当者 楠本 眞
 電話番号 0 2 9 8 - 6 1 - 3 2 8 1
【ブルーフの要否】 要

特 2 0 0 0 - 2 9 2 4 8 3

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 2 9 2 4 8 3
受付番号	5 0 1 0 0 7 8 2 0 0 4
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7 0 6 9
作成日	平成 1 3 年 9 月 2 8 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 5月30日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成13年 6月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2000-292483

【承継人】

 【識別番号】 000156581

 【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【承継人代理人】

 【識別番号】 100077698

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 吉田 勝広

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 010135

 【納付金額】 4,200円

【その他】 譲渡証書及び共有者の同意書は、本日付け提出の手續補
足書により提出した。

【提出物件の目録】

 【包括委任状番号】 9717259

【ブルーフの要否】 要

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 0 3 1 0 7 0]

1. 変更年月日	1 9 9 7 年 3 月 5 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区八丁堀 2 - 2 6 - 9
氏 名	財団法人 バイオインダストリー協会

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 工業技術院長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 〔000156581〕

1. 変更年月日	1996年 8月27日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都千代田区東神田一丁目9番8号
氏 名	環境エンジニアリング株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301000011]

1. 変更年月日	2001年 1月 4日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名	経済産業省産業技術総合研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 4 月 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所